

HLA - A * 02/24 限制的 HBcAg 表位特异性 细胞毒 T 细胞克隆的建立及分析

唐祖明 郑纪山 张胜子 杨玉志 张益红

摘要 目的 建立 HLA - A * 0201/2403 限制的 HBcAg 表位特异性 CTL 细胞克隆。方法 HLA - A * 0201/2403 阳性 HBV 感染者的外周血单个核细胞(PBMC)分别用限制性表位肽 HBe18 ~ 27 和 HBe117 ~ 125 刺激,并以有限稀释法进行克隆化,期间单独使用植物血凝素(PHA)及联合使用表位肽刺激。用免疫荧光、流式细胞术以及乳酸脱氢酶释放实验对所获克隆进行鉴定。**结果** 从 HBe18 ~ 27 活化的细胞中获得 29 株细胞克隆,其中 28 株为 CD8⁺T 克隆,均具有特异性细胞毒活性。从 HBe117 ~ 125 激活的细胞中获得 12 株 CD8⁺T 克隆,其中 9 株有明显的细胞毒活性,另 3 株细胞毒活性则显著低下。克隆化过程中单独使用 PHA 及联合使用表位肽,克隆形成率分别为 15.62% 和 14.58%。**结论** 分别用表位肽 HBe18 ~ 27 和 HBe117 ~ 125,能激活 HLA - A * 0201/2403 阳性 HBV 感染者的 CD8⁺T 细胞。建立 CD8⁺T 克隆过程中,表位肽的使用不能提高克隆形成率。

关键词 HBV 感染 细胞毒 T 细胞 细胞克隆 表位

Generation and Analysis of HLA - A * 02/24 Restricted HBcAg - specific Cytotoxic T Lymphocyte Clones in a Patient with Chronic Hepatitis

B. Tang Zuming, Zheng Jishan, Zhang Shengzi, et al. State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China

Abstract Objective To generate HLA - A * 0201 and A * 2403 restricted HBcAg - specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were derived from a HLA - A * 0201/2403 - positive patient with chronic hepatitis B. PBMCs were stimulated respectively using two synthetic peptides (HBe18 ~ 27 and HBe 117 ~ 125), and epitope - specific CTL clones were generated by limiting dilution technique with PHA alone or combined with synthetic peptides. The cell clones were then characterized by IF staining, FCM and LDH release. **Results** After 2 weeks of in vitro stimulating PBMCs, specific CTL lines were established. 29 T clones were generated from those CTL lines using HBe18 ~ 27 stimulating. Among the 29 clones, 28 clones belonged to CD8⁺T cells and all displayed cytolytic activity. 12 CD8⁺T clones were generated from those CTL lines using HBe117 ~ 125 stimulating. Specific cytotoxic activity was observed in 9 of those clones. The other three displayed less cytolytic activity. In the process of cloning, PHA was used alone or combined with synthetic peptides, and the achievement showed a rate of 15.62% and 14.58%. **Conclusion** HBe18 ~ 27 and HBe117 ~ 125 are capable of activating CD8⁺T cells in PBMCs of HLA - A * 0201 /2403 patient with chronic hepatitis B. In the process of CD8⁺T cloning, synthetic peptides could not increase the rate of successful cloning.

Key words HBV; CTL; Cell cloning; Epitope

HBV 感染免疫发病机制的相关研究表明,细胞免疫,特别是细胞毒 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL,即活化的 CD8⁺T 细胞)在清除病毒和肝组织损伤中起着主要作用,其对 HBV 核心抗原(HBcAg)的反应能力影响了 HBV 感染的转归^[1]。因此对 CTL 细胞的研究成为关注热点。CTL 反应在人类受白细

胞相关抗原(HLA) I 类分子限定,尤其是 HLA - A。HLA - A 不同,所递呈的 CTL 表位也不同。本研究中,我们观察了 1 例 HLA - A 基因组合为 0201/2403 的慢性 HBV 感染者外周血 CTL 的特异性细胞毒活性,从中建立了 HLA - A 限制的两种不同 HBe 表位肽特异性 CTL 克隆,并对其特性进行了分析。

对象与方法

1. 对象:慢性乙肝患者,男性,39 岁,诊断依据 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》。患者血清检测:HBsAg、HBeAg、抗 - HBe 阳性以及 HBV - DNA 阳性,ALT 238 U/L(正常 40 U/L),抗 - HAV - IgM、抗 - HCV、抗 - HEV 以及抗 - HIV 均阴性。未进行抗病毒治疗。HLA - A * 0201/2403。

2. 方法:(1)外周血单个核细胞(PBMC)分离:采集肝素抗凝外周静脉血,经人淋巴细胞分离液分离 PBMC,将细胞数

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671929)

作者单位:210096 南京,东南大学生物电子学国家重点实验室(唐祖明、张胜子);210002 南京军区军事医学研究所(郑纪山);210008 南京大学附属鼓楼医院(杨玉志);210003 南京红十字血液中心(张益红)

通讯作者:唐祖明,电子信箱:tangzm@seu.edu.cn;郑纪山,电子信箱:zhengjishan@yaho.com.cn

调整至 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。(2)HLA - A 基因分型:采集 EDTA 抗凝血 2ml,过柱吸附法提取 DNA。HLA - A 基因分型采用 PCR - SSP 技术,使用 HLA - A 位点高分辨 SSP UNITRAY 试剂盒 (PEL - FREEZ 公司),按说明书操作。扩增产物电泳后用 PEL - FREEZ SSP 分析软件判断结果。(3)合成肽和 HBcAg 分别合成 HBc18 ~ 27 和 HBc117 ~ 125 表位肽,前者长度为 10 个氨基酸,序列 FLPSDFFPSV;后者长度为 9 个氨基酸,序列 EYLVSFGVW。由上海生工技术有限公司合成,纯度 > 98%。重组 HBcAg (rHBcAg) (Prospec 公司)。(4)PBMC 的抗原刺激:PBMC 按 $2 \times 10^6/\text{ml}$,加入含 10% AB 型灭活人血清的 RPMI - 1640 完全培养液,于 24 孔培养板添加 1 毫升/孔。每孔加入 rHBcAg1 μg ,并分别加入合成肽 HBc18 ~ 27 (A 样本)和 HBc117 - 125 (B 样本)10 μg 。第 3 天和第 10 天补入 1ml 完全培养液,并加入重组人白介素 - 2 (rhIL - 2,终浓度 100U/ml, R&D 公司);第 7 天换部分培养液,加合成肽、rhIL - 2 和异体饲养细胞 $2 \times 10^6/\text{孔}$ (异体饲养细胞系用异体 PBMC 预先按 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加丝裂霉素 C 处理,以使其失去增生能力)。(5)激活细胞的克隆化:A 样本和 B 样本经培养 2 周,分别收集激活的细胞,采用有限稀释法进行克隆化:于 96 孔培养板加 0.8 ~ 1 个细胞/(0.1 毫升 · 孔),同时加 rhIL - 2 (终浓度 100U/ml)、PHA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和异体饲养细胞 ($2 \times 10^5/\text{孔}$)。其中 A 样本另设一联合使用合成肽 HBc18 - 27 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的克隆化板,以观察合成肽对克隆化的影响。同时设不加激活细胞的对照孔。间隔 7 天重复加刺激物和饲养细胞。观察克隆生长,根据细胞生长情况扩大培养,每 3 天换部分液体,维持期间每 10 天重复刺激 1 次。(6)HBc 表位特异性细胞克隆的表型鉴定: 1×10^6 个克隆细胞以 PBS 洗涤后,分别与鼠抗人 CD3 - FITC/ CD8 - PE/CD4 - FITC 单克隆抗体 (Mabtech 公司)室温避光孵育 30min,以 PBS 洗去未结合抗体,经流式细胞仪 (FACS calibur) 分析。(7)细胞内细胞因子检测: $1 \times 10^6/\text{ml}$ 克隆细胞加 Brefeldin A (晶美生物公司)10 μg ,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5h,用 PBS 缓冲液洗 1 次,经固定和破膜后,分别与 FITC - 抗 IFN - γ /抗 IL - 4 (Mabtech 公司)混合 30min,洗去游离抗体后,加 2% 多聚甲醛 500 μl ,经流式细胞仪分析。(8)特异性细胞毒活性试验:①靶细胞:自体 PBMC 经 EBV 诱导建立 B 淋巴瘤母细胞系 (B - LCL) (建系方法见文献^[2])。B - LCL $2 \times 10^6/\text{ml}$,分别与 2 种合成肽 10 μg 混合过夜,洗去游离和合成肽后,即为靶细胞;②细胞毒检测:采用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放试验试剂盒 (Promega 公司),按说明书操作。

结 果

1. HLA - A 基因型及 HLA - A 限制性表位肽的选择:应用 PCR - SSP 分型技术,该患者的 HLA - A 等位基因组合为 0201/2403。分别合成 HLA - A * 0201 限制的 CTL 优势表位肽 HBc18 - 27^[3] 和 HLA - A * 24 限制的 CTL 表位肽 HBc117 - 125^[4]。两种合成肽用作乙肝特异性 CTL 细胞群 (HBV - specific

CTL lines) 建立中的抗原刺激物。

2. HBc 表位特异性 CTL 的激活:新鲜分离的 PBMC 用两种合成肽分别激活后测细胞毒活性 (效靶比例 40:1),A 样本为 57.6%,B 样本为 33.9%。上述结果提示 PBMC 中的表位特异性 CD8⁺T 被激活。

3. T 细胞克隆形成及表型分析:A 样本单独用 PHA 做刺激物的克隆形成率为 15.62% (15 株/96 孔),联合用合成肽的克隆形成率为 14.58% (14 株/96 孔),提示已活化的 T 细胞在克隆化过程中添加合成肽对克隆形成并无促进作用。以上 29 个克隆中 28 株为 CD3⁺/CD4⁻/CD8⁺T 细胞 (12 株 Tc1,9 株 Tc0,7 株 Tc2),1 株为 CD3⁺/CD4⁺/CD8⁻T 细胞 (Th0)。从 B 样本中获得 12 株克隆,均为 CD3⁺/CD4⁻/CD8⁺T 细胞 (8 株 Tc1,4 株 Tc2)。对照的 40 个孔中无细胞生长。

4. CD8⁺T 细胞克隆的特异性细胞毒活性:CTL 克隆株的特异性细胞毒试验的效靶比例为 2.5:1。A 样本 28 株 CTL 克隆的细胞毒活性在 32.5% ~ 100% (图 1);B 样本的 9 个克隆株有明显的细胞毒活性 (34.5% ~ 92.4%),3 个克隆株 (1 株 Tc1 和 2 株 Tc2) 的细胞毒活性仅为 7.4%、11.5% 和 14.5% (图 2)。

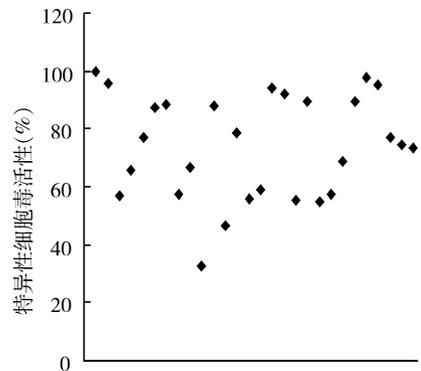


图 1 HBc18 ~ 27 特异性 CD8⁺T 细胞克隆的特异性细胞溶解率

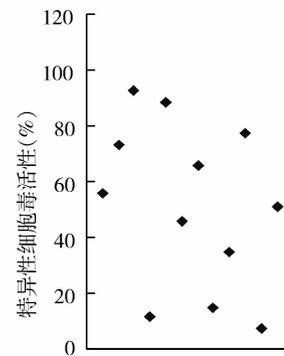


图 2 HBc117 ~ 125 特异性 CD8⁺T 细胞克隆的特异性细胞溶解率

讨 论

CTL 表位在 CTL 活化过程中起着关键的作用并决定了 CTL 的特异性生物学效应^[5]。多年来人们致力于不同 HLA - A 限制的 HBV 特异性 CTL 优势表位肽的筛选,研究最多最深入的是 HLA - A * 02 限制性 CTL 表位^[3],目前至少已鉴定出 16 个相关表位,其中 HBc18 - 27 表位肽的应用和报道最多。HLA - A * 02 是我国常见的等位基因型,高达 30% ~ 52%,慢性 HBV 感染者也达到 35%^[6,7]。因此对 HLA - A * 0201 的 HBV 感染个体的研究可以反映相当部分人群的情况。HBc117 - 125 表位由 Sobao 等鉴定,主要与 HLA - A * 2402 相匹配,而对 A * 24 其他亚型的免疫原性的报道较少。由于 HBV 感染中,HBcAg 特异性 CTL 反应控制病毒的作用更强,在疾病转归中起着重要作用^[1,8],因此本研究中我们合成了与患者 HLA - A 等位基因相应的两种 HBc 特异性 CTL 表位。用这两种表位激活的 HBV 特异性 CTL 细胞群表现出特异性细胞毒活性。表明这两种肽在本例患者具有免疫原性。

HBV 特异性 CTL 应答在乙型肝炎免疫发病机制中的作用受到广泛关注。慢性乙肝临床常表现为急性发作和病情稳定交替出现,静止期特异性 CTL 低表达,急性发作时特异性 CTL 频数和活性增高,提示机体处于免疫激活状态,有研究表明此时易于出现 HBV - DNA 复制终止和 HBeAg 的血清学转换,有可能获得控制病毒的效果^[9]。本研究中患者为慢性 HBV 感染急性发作,入院后虽病情好转,ALT 下降,但一直未达到正常水平,HBV - DNA 持续阳性,HBeAg 也未发生转化。我们用两种表位肽激活的特异性 CTL 细胞群显示明显的特异性细胞毒活性,提示机体确有免疫活性增强,且与病毒并存。但在随后建立的 CTL 克隆中有 3 株克隆的特异性细胞毒活性低下,这是否反映了患者不充分的 CTL 反应有待进一步研究。不充分的 CTL 反应除可造成 HBV 持续存在,还可能有助于非特异性 T 细胞造成的肝损害^[10]。由于慢性 HBV 感染临床表现的多样性和免疫发病机制的复杂性,特异性 CTL 的功能、状态以及

到底如何发挥效应,需要更多病例的研究来加以阐释。

在使用有限稀释法对表位肽活化的 CTL 进行克隆化时,常常联合使用非特异性刺激物和特异性表位肽^[11]。我们在克隆化过程中单独使用 PHA 及联合使用合成肽,结果显示联合使用两种刺激物,并不能增加克隆形成率。

参 考 文 献

- 1 Zhang Y, Li S, Shan M, *et al.* Hepatitis B virus core antigen epitopes presented by HLA - A2 single - chain trimers induce functional epitope - specific CD8 + T - cell responses in HLA - A2 * 1/Kb transgenic mice [J]. *Immunology*, 2007, 121 (1) : 105 - 112
- 2 唐祖明, 高健, 何长伦, 等. 乙型肝炎病毒感染者 B 淋巴细胞细胞的建立 [J]. *医学研究杂志*, 2008, 37 (9) : 23 - 26
- 3 Bertoni R, Sidney J, Fowler P, *et al.* Human histocompatibility leukocyte antigen - binding supermotifs predict broadly cross - reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100 (3) : 503 - 513
- 4 Sobao Y, Sugi K, Tomiyama H, *et al.* Identification of hepatitis B virus - specific CTL epitopes presented by HLA - A * 2402, the most common HLA class I allele in East Asia [J]. *J Hepatol*, 2001, 34 (6) : 922 - 929
- 5 Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, *et al.* Cytotoxic T cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126 (1) : 32 - 41
- 6 王振雷, 何路军, 刘艳平, 等. 河北汉族 HLA - A 基因多态性及其分布特征 [J]. *河北医药*, 2007, 29 (9) : 907 - 909
- 7 卢晓敏, 王文远, 孙成刚. HLA - A 基因频率与 HBV 感染的相关性研究 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2006, 22 (2) : 91 - 92
- 8 Maini MK, Boni C, Lee CK, *et al.* The role of virus - specific CD8 + cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection [J]. *J Exp Med*, 2000, 191 (8) : 1269 - 1280
- 9 Liaw YF. Hepatitis flares and hepatitis B e antigen seroconversion; implication in anti - hepatitis B virus therapy [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18 (3) : 246 - 252
- 10 张蓓, 付晓岚, 王靖雪, 等. 乙型肝炎患者 HBcAg18 - 27 表位特异性细胞毒性 T 细胞的研究. *免疫学杂志*, 2007, 23 (3) : 319 - 322, 330
- 11 Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, *et al.* HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection [J]. *J Immunol*, 1993, 150 (10) : 4659 - 4671

(收稿:2009 - 08 - 03)

(修回:2009 - 10 - 14)

启事 来稿请注明第一作者简历、联系电话、电子信箱,请注明论文基金项目名称及基金编号。为便于安排审稿,请务必通过电子信箱投稿,请附中英文摘要,文章名、作者名及作者单位需译成英文。